

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
Факультет екологічної безпеки, інженерії та технології  
Кафедра хімії і хімічної технології

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач випускової кафедри

\_\_\_\_\_ А. Д. Кушовська

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 р.

**КЛАСИФІКАЦІЙНА РОБОТА  
(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)**

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

за спеціальністю: 161 «Хімічні технології та інженерії»

освітньо-професійної програми «Хімічні технології альтернативних  
енергоносіїв»

**Тема: «Особливості використання ліпідної фракції мікроводорості  
*Chlorella vulgaris* для одержання дизельного біопалива»**

Виконавець: студент 407 групи ННІЕБ Штекель Я.І. \_\_\_\_\_

Керівник: доц., к.х.н, Кушовська А.Д. \_\_\_\_\_

Нормоконтролер: доцент, к.х.н. Максимюк М.Р. \_\_\_\_\_

Київ 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій  
Кафедра хімії і хімічної технології  
Спеціальність: 161 «Хімічні технології та інженерія»  
ОПП «Хімічні технології альтернативних енергоносіїв»

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Завідувач кафедри  
\_\_\_\_\_А.Д. Кустовська  
«\_\_»\_\_\_\_\_ 2021 р.

**ЗАВДАННЯ**  
**на виконання дипломної роботи**

Штекель Ярослав Ігорович

1. Тема дипломної роботи: «Особливості використання ліпідної фракції мікроводорості *Chlorella vulgaris* для одержання дизельного біопалива» затверджена наказом ректора від «10» квітня 2021 р. №480/ст.

2. Термін виконання роботи: з 25.05.2021 р. по 21.06.2021 р.

3. Вихідні дані до роботи: мікроводорість *Chlorella vulgaris*

4. Зміст пояснювальної записки: Вступ. Розділ 1. Використання біомаси третього покоління для виробництва біопалив 2. Методи і об'єкти дослідження. Розділ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРОВОДОРОСТІ *CHLORELLA VULGARIS* І ВИЗНАЧЕННЯ СКЛАДУ ЇЇ ЛІПІДНОЇ ФРАКЦІЇ.

5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: таблиці – основні фізико-хімічні характеристики дизельного палива по EN 590 і біодизельного палива по ASTM 6751 EN 14214; хімічний склад мікроводорості *Chlorella vulgaris*, вирощеної на різних середовищах; вміст жирних кислот в ліпідах мікроводорості *Chlorella vulgaris* за результатами Нагорнов, Мещерякова, Дмитрієв та ін; кількісний склад жирних кислот ліпідів мікроводорості *Chlorella*

vulgaris за результатами Клячко-Гурвич і Семененко; фізико-хімічний склад стічних вод до і після культивування у ньому штаму мікроводорості *Chlorella vulgaris*; графіки - загальна схема переестерифікації тригліцеридів жирних кислот; механізм реакції алкоголізу тригліцеридів у присутності гомогенного кислотного каталізатора; механізм реакції алкоголізу тригліцеридів у присутності гомогенного лужного каталізатора; схема отримання біодизельного палива із біомаси мікроводорості *Chlorella vulgaris*; коефіцієнти швидкості росту виділених штамів, культивованих у різних середовищах; динаміка росту клітин активного штаму мікроводорості *Chlorella vulgaris*; співвідношення основних клітинних компонентів штаму *Chlorella vulgaris*; ІК-спектр ліпідної фракції мікроводорості *Chlorella vulgaris*; ІК-спектр рафінованої ріпакової олії.

#### 6. Календарний план-графік

№ з/п	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Отримання теми завдання, пошук літературних джерел	25.05.2021	
2	Підготовка та оформлення основної частини (Розділ 1)	25.05.2021	
3	Підготовка та оформлення основної частини (Розділ 2)	27.05.2021	
4	Підготовка та оформлення основної частини (Розділ 3)	30.05.2021	
5	Пошук додаткової літератури, необхідної для оформлення експериментальної частини (Розділ 4)	01.06.2021	
6	Формулювання висновків до розділів та загальних висновків	02.06.2021	
7	Попередній захист дипломної роботи на кафедрі	03.06.2021	
8	Оформлення пояснювальної записки до попереднього представлення на кафедрі, консультація з нормоконтролером	10.06.2021	
9	Отримання необхідних рекомендацій, урахування зауважень та підготовка до захисту	10.06-15.06.2021	

Дата видачі завдання: «25» травня 2021 р.

Керівник дипломної роботи \_\_\_\_\_

доц., к.х.н, Кустовська А.Д.

Завдання прийняв до виконання \_\_\_\_\_

Штекель Я.І.

## РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи: «Особливості використання ліпідної фракції мікроводорості *Chlorella vulgaris* для одержання дизельного біопалива»: 49с., 9 рис., 5 табл., 70 літературних джерел.

**Мета роботи** – використання ліпідної фракції мікроводорості *Chlorella vulgaris* для одержання дизельного біопалива.

**Об’єкт дослідження** – процес культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* для одержання ліпідної фракції

**Предмет дослідження** – мікроводорість *Chlorella vulgaris*

**Метод дослідження** – літературний огляд тематичної літератури за останні 30 років

У роботі розглянуто процес культивування і хімічний склад мікроводорості *Chlorella vulgaris* з метою подальшого використання її ліпідної фракції для одержання біодизельного палива.

CHLORELLA VULGARIS, МІКРОВОДОРОСТЬ, БІОПАЛИВО,  
БІОДИЗЕЛЬ, ЛІПІДИ.

## Зміст

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. Використання біомаси третього покоління для виробництва біопалив .....	10
1.1. Біомаса мікроводоростей як перспективне джерело сировини для виробництва біопалива. ....	10
1.1.1. Технологія отримання біодизельного палива з біомаси мікроводоростей.....	13
1.1.2. Процес переестерифікації.....	17
1.1.3 Основні фізико-хімічні показники біодизельного палива .....	20
1.1.4 Переваги і недоліки біодизельного палива.....	22
1.2 Хімічний склад мікроводорості <i>Chlorella vulgaris</i> .....	24
1.3 Висновок до розділу .....	27
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	27
2.1 Об'єкти дослідження .....	27
2.1.1 Загальні відомості про мікроводорість <i>Chlorella vulgaris</i> .....	28
2.2 Методи дослідження.....	30
2.2.1 Методика культивування та визначення продуктивності мікроводорості.....	31
2.2.2 Методика концентрування, сушіння і дезінтеграції біомаси мікроводорості.....	32
2.2.3 Методика екстракції біомаси мікроводорості.....	32
2.2.4 Визначення ліпідного складу методом тонкошарової хроматографії..	33
2.2.5 Визначення жирнокислотного складу хроматографічним методом ....	34
2.2.6 Синтез етилових естерів жирних кислот (біодизельного палива) .....	35

2.3 Висновок до розділу .....	35
РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРОВОДОРОСТІ CHLORELLA VULGARIS І ВИЗНАЧЕННЯ СКЛАДУ ЇЇ ЛІПІДНОЇ ФРАКЦІЇ .....	36
3.1. Культивування мікроводорості Chlorella vulgaris з використанням комунально-побутових стічних вод як поживного середовища .....	36
3.2 Висновок до розділу .....	42
ВИСНОВКИ.....	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ БІБЛЮГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ.....	44

## ВСТУП

Біоенергетика - сектор економіки, що активно розвивається і базується на джерелах енергії органічного походження, які використовуються як палива для виробництва тепла і електрики [1].

В сучасному світі на стадії масштабно впроваджуваних або таких, що розробляються, перебуває велика кількість різних технологій використання біомаси у сировинних та енергетичних цілях. Перспективним джерелом біомаси для одержання енергії є фототрофні мікроорганізми. У розробці таких біотехнологічних процесів важливим є не тільки врахувати можливість одержання різних цільових продуктів із використовуваної біомаси, а також мінімально впливати на навколишнє середовище. Таким вимогам максимально відповідає біомаса мікроводоростей.

Станом на 2010 р світове виробництво біомаси мікроводоростей становило близько 7000 т/рік, основна маса якого припадала на Китай, Японію, Індію, Німеччину, США, Тайвань, Ізраїль та Австралію. Такі мікроводорості, як *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Cryptocodinium cohnii* та *Botryococcus braunii* використовуються в фармацевтичній та харчовій промисловості, виробництві кормів для тварин, косметики, біопалива та ін. [3, 4]

Найпотужнішим у Європі виробником біомаси мікроводоростей вважається біотехнологічна компанія Ingredion B.V. яка знаходиться у Нідерландах, вона славиться колосальним досвідом у реалізації технологічних схем із вирощування мікроводоростей з метою отримання збагаченої ліпідами біомаси. Одним з основних об'єктів їхніх розробок, задіяаних у технологічних схемах фототрофних культивувань, є мікроводорість роду *Chlorella* [5].

Цікавість до фототрофних мікроорганізмів викликана високою швидкістю накопичення біомаси (20-30 разів) ніж у традиційних сільськогосподарських культур. Головним плюсом є те, що для культивування мікроводоростей не потрібні землі які треба обробляти, орати,здобрювати...

Для цього можуть бути використані землі які підлягають рекультивації або непридатні для сільськогосподарського культивування [6].

З усіх видів мікроводоростей, які використовують для масового культивування, найбільш поширеним є вид водоростей *Chlorella vulgaris*, що має високий ступінь використання світлової енергії (ККД фотосинтетичний 3,6%) і оптимальний хімічний склад клітини за вмістом білків, вітамінів, незамінних амінокислот та набором мікроелементів і біологічноактивних речовини [7].

### **Актуальність теми**

В сучасному світі широко впроваджуються різноманітні технології використання біомаси у сировинних та енергетичних цілях. Перспективним джерелом біомаси для одержання енергії є фототрофні мікроорганізми. У розробці таких біотехнологічних процесів важливим є не тільки врахувати можливість одержання різних цільових продуктів із біомаси, а також мінімально впливати на навколишнє середовище. Таким вимогам максимально відповідає біомаса мікроводоростей.

### **Мета і завдання дипломної роботи**

**Мета роботи** – використання ліпідної фракції мікроводорості *Chlorella vulgaris* для одержання дизельного біопалива

**Об'єкт дослідження** – процес культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* і одержання з неї ліпідної фракції

**Предмет дослідження** – мікроводорість *Chlorella vulgaris*

**Метод дослідження** – літературний огляд тематичної літератури за останні 30 років.

### **Наукова новизна одержаних результатів**

На основі проведеного дослідження прказана принципова можливість використання біомаси мікроводорості *Chlorella vulgaris*, культивованої на



поживному середовищі комунальних стічних вод, для одержання біодизельного палива шляхом переестерифікації ліпідної фракції. Застосування цього методу культивування біомаси дозволяє одночасно вирішувати дві важливі задачі: енергетичну – одержання біодизелю і екологічну – очищення стічних вод.

### **Практичне значення одержаних результатів**

Результати роботи можуть бути впроваджені для розробки технології масштабного культивування біомаси з використанням комунальних стоків міського господарства

### **Особистий внесок студента у роботу**

Студент підібрав та проаналізував наукову літературу з даної теми. Спільно з керівником роботи опрацював методи дослідження і самостійно провів дослідження з обробки та аналізу літератури на тему «Особливості використання ліпідної фракції мікроводорості *Chlorella vulgaris* для одержання дизельного біопалива».

Студент самостійно побудував графічні залежності та оформив дипломну роботу.

Обговорення та інтерпретація одержаних результатів проводилася студентом спільно з науковим керівником.

## **РОЗДІЛ 1. Використання біомаси третього покоління для виробництва біопалив**

### **1.1. Біомаса мікроводоростей як перспективне джерело сировини для виробництва біопалива.**

В останні десятиліття спостерігається зменшення залучення вуглеводневої сировини у виробництві моторних рідких палив, у зв'язку з тим, що традиційну сировину заміняють на альтернативну сировину рослинного походження. Головною причиною цього є зменшення відомих запасів нафти високої якості, труднощі знаходження нових родовищ та виснаженість тих, що існують. Всі ці причини викликають нестабільну ціну на вуглеводневу сировину, при тому, що попит на нафту та продукти її переробки зростає. Ситуація ускладнюється також тим, що необхідно знизити викиди "парникового газу" -  $\text{CO}_2$  - в навколишнє середовище. Саме через ці проблеми необхідно впроваджувати альтернативні "зелені" технології та розвиток нових галузей промисловості - біоенергетики.

Одним із основних джерел енергії, яке стоїть поряд з сонячною, вітровою і геотермальною енергією вважають рослинну біомасу [8].

Існує три покоління поновлюваних джерел рослинного походження, які слугують сировиною для утворення біопалив.

1. Перше покоління включає традиційні сільськогосподарські культури із високим вмістом цукрів і ліпідів. Для одержання біоетанолу, необхідні цукри, які слугують для нього сировиною, а ліпіди являють собою компоненти сумішевого біодизелю.

Запровадження цих сировинних джерел пов'язане з такими недоліками:

- для вирощування харчових продуктів, необхідне використання орних земель;

- великі затрати на обробку землі та внесення більш дорогих добрив та пестицидів.
2. Друге покоління включає в себе траву та деревину, тобто біомасу не хардового призначення. Така сировина містить лігнін та целюлозу, і може бути використана як для прямого спалювання, так і для переробки у горючі гази за допомогою піролізу. Виробництво на основі такої сировини біопалив є менш витратним. Тут присутні такі недоліки, як:
- невисока віддача із одиниці площі
  - необхідне використання великих площ земель, для вирощування.
3. Третє покоління включає в себе біомасу із мікроводоростей [9]. Такі водорості розглядають як відновлюваний біологічний ресурс, який можна легко відтворити за допомогою фотосинтетичного самозабезпечення усіма поживними речовинами [10]. Біомаса таких водоростей має велику калорійність, малу в'язкість, низьку щільність та високий вміст паливо придатних ліпідів [11].

Основні переваги мікроводоростей такі:

- велика поглинальна здатність по CO<sub>2</sub>;
- швидке відтворення клітин та велика конверсійна ефективність фотонів (близько 3...8% проти 0,5% для рослин на землі;
- не дуже важлива якість води для росту, саме тому на їх культивування може піти стічна, забруднена, солоня та інша вода;
- мікроводорості здатні використовувати у процесі своєї життєдіяльності фосфор та азот із будь яких джерел стічних вод (для прикладу, сільськогосподарські стоки, промислові стічні води), тим самим вони забезпечують більше біологічне очищення стічних вод;
- мікроводорості можуть вирощуватися на пустельній та засоленій землі, яка б не придатна для сільськогосподарської харчової продукції;
- виробництво не є сезонним, тому сировина отримується повний рік;

- для культивування мікроводоростей не потрібне залучення пестицидів і добрив;
- мікроводорості являють собою сировину для великого спектру продуктів (такі як білки, полісахариди, та.ін.);
- для організації виробництва мікроводоростей не потрібно складного обладнання та високої автоматизації виробництва[7, 15-18].

Не дивлячись на ряд переваг, використання мікроводоростей для утворення біопалива має деякі обмеження. Це насамперед пов'язано із збором врожаю, сушінням біомаси та виділенням жирів, що зменшує їх привабливість у промисловості [10].

Існує багато шляхів перетворення біомаси мікроводоростей у паливо. Їх поділяють на три таких групи:

- 1) одержання біопалив (біодизель, біоетанол) з органічних речовин (жирів і вуглеводів), що містяться у біомасі мікроводоростей;
- 2) використання біомаси водоростей як біопалива;
- 3) використання як біопалив продуктів життєдіяльності мікроводоростей (етанол, метан).

Найбільше значення на сьогодні набули біодизельне паливо і біоетанол [12].

Біоетанол - це етиловий спирт звільнений від води максимального відсотку (99,5%). Біоетанол утворюється внаслідок переробки рослинної сировини, яка має великий вміст целюлози або крохмалю. Головним і найпростішим способом утворення біоетанолу є бродіння. У біоетанолу у порівнянні з бензином більше октанове число (104-108 умовних одиниць), але менша теплота згоряння (23,5 МДж / кг, у бензину - 44 МДж / кг). У якості автомобільного бензину біоетанол використовується як у чистому вигляді, так як і у суміші з паливом. У залежності від відсотку спирту паливні суміші позначають E5, E10, E85 і т.д. (Де E - від англ. Ethanol, а цифри це об'ємна частка спирту в відсотках). Застосування біоетанолу в стандартному двигуні

внутрішнього згоряння обмежують його гігроскопічність та агресивність до гумовотехнічних деталей [13].

Біодизельне паливо (біодизель) є сумішю моноалкільних (метилових або етилових) естерів жирних кислот, які отримують за допомогою естерифікації рослинних або тваринних жирів. Біодизельне паливо на відміну від біоетану має менше недоліків. Саме через це є найпоширенішим видом палива, а для його виробництва найбільш вигідною сировиною є біомаса мікроводоростей [14].

### **1.1.1. Технологія отримання біодизельного палива з біомаси мікроводоростей**

Технологію утворення біодизельного палива із мікроводоростей можна поділити на такі етапи:

1. Культивування мікроводоростей
2. Концентрування біомаси мікроводоростей
3. Дезінтеграція клітинних стінок
4. Екстракція
5. Відгонка екстрагенту
6. Синтез біодизельного палива. Реакції алкоголізу (трансестерифікації).

*Культивування мікроводоростей* включає утворення достатньо великої кількості біомаси мікроводоростей із високим відсотком ліпідних компонентів [19]. Для того, щоб збільшити вміст ліпідів створюють стресові умови. Такі умови створюються за допомогою дефіциту азоту, що призводить до накопичення ліпідів у кількості, яка в 4-6 разів перевищує їх вміст у клітинах, коли стресові умови відсутні. [10]. Проте стресові умови не можуть дати максимально великого врожаю.

Культивування мікроводоростей для накопичення біомаси проводять у закритих системах (фотобіореакторах) і у відкритих басейнах або ставках. Існують також гібридні системи, які поєднують в собі обидві системи. Для того, щоб визначити спосіб вирощування водоростей, необхідно визначити обсяг

капітальних вкладень на утворення фотосистеми та операційних витрат на проведення процесу. В більшості випадків затрати на конструювання закритого фотобіореактору є більшими, аніж на культивування у ставках [21].

Практика показала, що закриті фотобіореактори більш затратні і у своїй експлуатації, тому що в них важко досягти дотримання оптимальних параметрів масопереносу [11]. Тим не менш, культивування у ставках, не дивлячись на свої мінімальні витрати, не забезпечує велику швидкість відтворення біомаси. Більше цього, можливе також забруднення сировини чужорідним біологічним матеріалом, таких як бактерії, гриби і т.і., що відбивається на якості отриманої сировини [22]. Найбільш оптимальним є культивування у трубчастих фотобіореакторах.

*Концентрування біомаси мікродоростей.* Біомаса із високим вмістом ліпідів, що отримується піддається концентруванню. Відома велика кількість методів розділення клітин і культурального середовища [17, 18-20]: ультрафільтрація, центрифугування, седиментаційне осадження, ультразвукова обробка, флотація і флокуляція. Але всі ці методи мають недоліки, які негативно впливають на собівартість процесу.

*Дезінтеграція клітинних стінок.* Для того щоб досягти більш повного вилучення ліпідної фракції застосовують дезінтеграцію клітинних стінок. Дезінтеграція – це руйнування клітинної оболонки для того щоб отримати необхідну продукцію. У даний час відомо декілька способів руйнування клітинних оболонок, які розділяють на три групи [23]:

- 1) фізичний вплив на сировину;
- 2) хімічний вплив на сировину;
- 3) хіміко-ферментативний вплив на сировину.

До фізичних методів відносяться: механічні (розтирання, розчавлювання, подрібнення і гомогенізація); дультразвукові, низько та високотемпературні; осмотичний шок. Хімічні методи засновані на руйнуванні оболонки клітини під впливом кислот, лугів і детергентів. При хімікоферментативному впливі використовується антибіотики і гідролітичні ферменти, ПАР.

Фізичні методи більш економічні, ніж хімічні та хімікоферментативні. Їхньою перевагою є те що вони здійснюються без застосування дорогих реактивів та ферментних препаратів. І ще однією перевагою є те, що ці методи не вибагливі, але обробка може вплинути на якість продукту який отримуємо. Обережне та вибіркоче руйнування може бути реалізоване при застосуванні хімічних і хіміко-ферментативних методів.

Дезінтеграційний метод визначається метою роботи. Хімікоферментативний вплив на сировину застосовується у наукових дослідженнях для того щоб виділити (без руйнування) різних субклітинних структур (органел, мембран і т.д.), також для того щоб отримати протопластів. Методи хімічні у більшості застосовуються для отримання харчового білка або продукції його гідролізу. Для того щоб отримати внутрішньоклітину речовину (у тому числі ліпіди) прийнятні фізичні методи.

*Екстракція.* Виділення ліпідів з біомаси мікроводорості здійснюють методом екстракції. Екстракцію ліпідів мікроводоростей розділяють на екстракцію із вологою біомасою (де виділення цільового продукту ускладнене через наявність культуральної рідини, що у свою чергу призводить до невисокого виходу продукту у процесі екстракції), і екстракцію ліпідів із сухої біомаси мікроводоростей, недоліком якої є великі витрати енергії для сушіння біомаси [24].

Екстракція по Сокслет - це метод, який дозволяє повністю вилучити усі ліпіди, наявні у клітинах мікроводоростей, у результаті досягається 100% вилучення. Завдяки тому що відбувається циркуляція розчинника в екстракторі, клітини біомаси взаємодіють із свіжим органічним розчинником у результаті чого рушійна сила максимальна, при цьому витрата розчинника мінімізується [10]. Як екстрагент використовують розчинники органічного походження (хлороформ, чотирьох хлористий вуглець, діетиловий ефір, гексан і суміш етанолу та петролейного ефіру та ін.).

*Відгонка екстрагента.* Після екстрагування розділяють екстракт та знежирену біомасу, шляхом центрифугування і випарювання. Біомаса яку

знежирили містить суміш залишків оболонок та клітинного білка у легкозасвоюваній формі, яку можна використовувати як кормову добавку

#### 7. Синтез біодизельного палива. Реакції алкоголізу (трансестерифікації).

Після відділення ліпіди направляються на синтез біодизельного палива. Багатореакторна безперервна технологія - це традиційна технологія отримання біодизельного палива: [23, 25]. Технологія виробництва біодизельного палива залишається незмінною з ХХ століття. Але за останнім часом модернізація технології дозволила безперервно отримувати біодизельне паливо, з більшим виходом (98%) метилових естерів рослинних жирів, зменшити час реакції з невеликими об'ємами технологічного обладнання. В технологіях синтезу біодизельного палива використовується: реактори із механічною лопатевою мішалкою [26], реактори роторного типу [27], реактори вихрового типу [28], реактори із обертовим електротромагнітним полем [25, 29].

Ескіз технологічної схеми виробництва біопалива із мікроводоростей показаний на рис. 1.

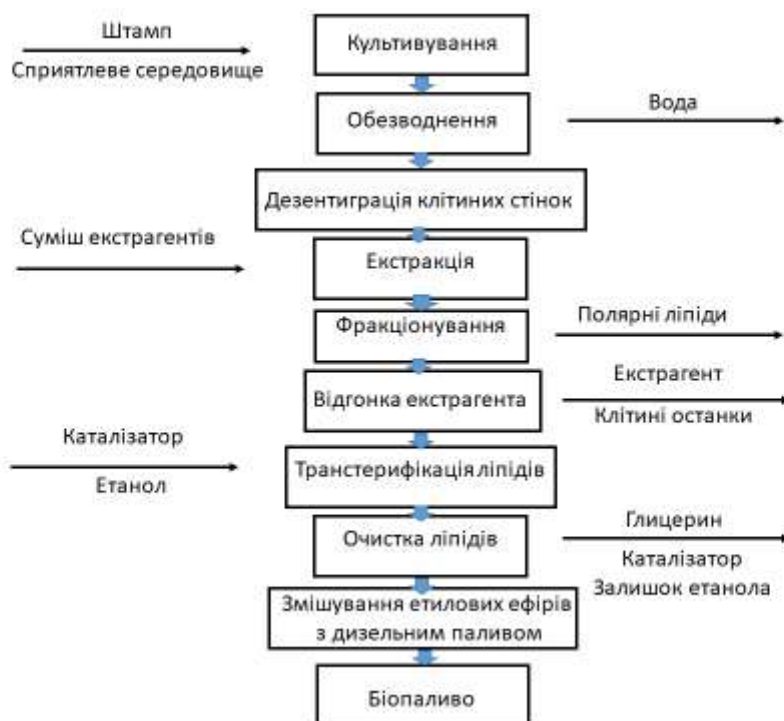


Рис 1. Схема отримання біодизельного палива із біомаси мікроводорості *Chlorella vulgaris*



### 1.1.2. Процес переестерифікації

Технологія традиційного отримання біодизельного палива полягає у проведенні реакції переестерифікації тригліцеридів жирних карбонових кислот при температурі 50-80 °C і атмосферному тиску.

Реакція відбувається при наявності каталізатора. Без каталізатора вона відбувається дуже повільно навіть при температурі 250°C. Методи які існують для отримання моноалкілні естерів рослинних олій зводяться до використання трьох основних способів, які розрізняються природою каталізаторів:

- алкохоліз тригліцеридів рослинних олій у присутності гомогенних каталізаторів лужного типу;
- алкохоліз тригліцеридів рослинних олій у присутності гомогенних каталізаторів кислотного типу;
- алкохоліз тригліцеридів рослинних олій у присутності гетерогенних каталізаторів [30].

На сьогодні практично все біодизельне паливо отримується за допомогою гомогенного каталізу. Застосування гомогенного каталізатора дає змогу проводити реакцію алкохолізу ліпідної сировини (складних естерів гліцерину та вищих карбонових кислот) зі спиртом у пом'якшених умовах. За своїми кінетичними параметрами, також через корозійну безпеку, найкращою з гомогенних систем вважаються системи на лужних каталізаторах. На сьогодні вони є найбільш поширеними.

Процеси, що застосовують гетерогенні (цеолітні) каталізатори, на даний момент знаходяться у стадії вивчення на лабораторному рівні. Їх використання потребує для забезпечення ефективності алкохолізу високих температур (200-220°C) та тисків (20-22 атм.) [13].

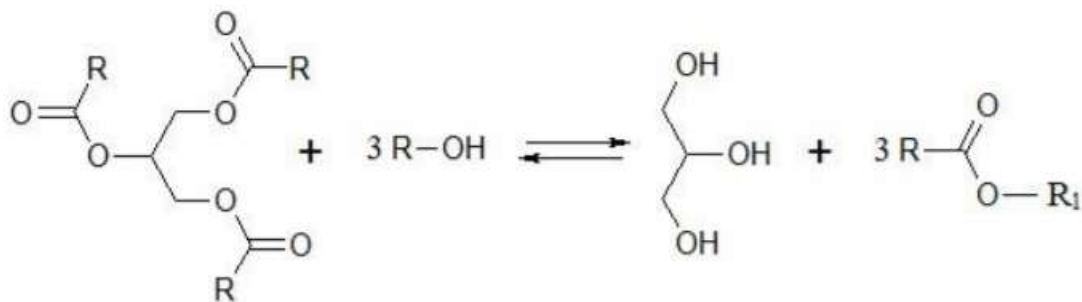


Рис. 2 Загальна схема переестерифікації тригліцеридів жирних кислот

Реакція переестерифікації (рис. 2) проходить покроково. Тип каталізатора визначає механізм реакції.

При кислотному каталізі спочатку відбувається протонування кисню карбонільної групи. Це підвищує електрофільність атому вуглецю, який знаходиться по сусідству, таким чином останній стає сприйнятливішим до приєднання нуклеофіла.

Виділяють три стадії протікання реакції переестерифікації, що каталізується кислотою (рис. 3):

- 1) протонування карбонільної групи кислотним каталізатором;
- 2) нуклеофільна атака алконола, утворення тетраедричних проміжних сполук;
- 3) міграція протона та розпадання проміжних сполук [31].

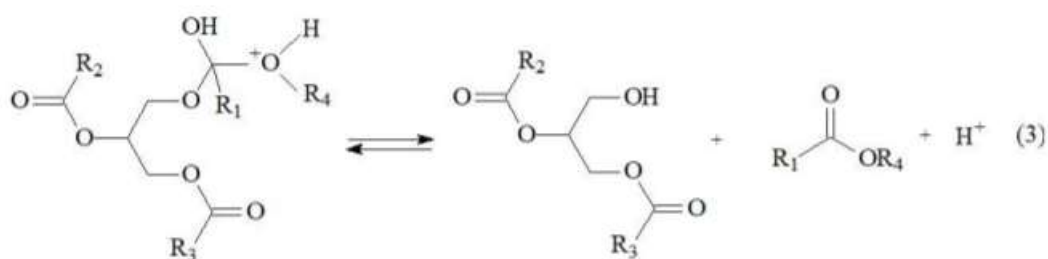
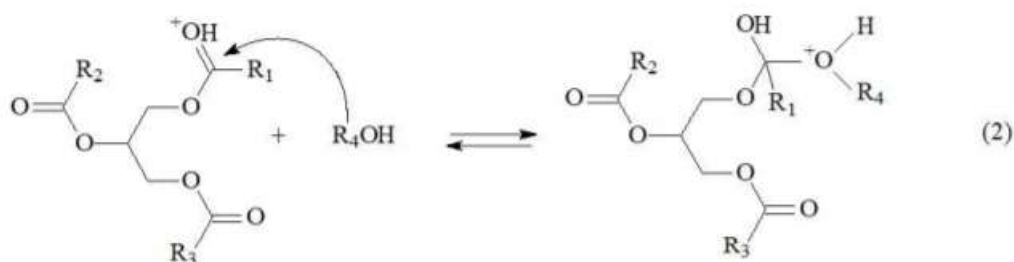
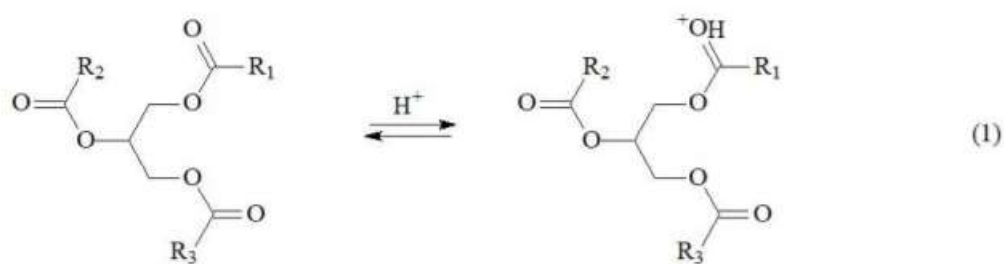


Рис.3 Механізм реакції алкоголізу тригліцеридів у присутності  
гомогенного кислотного каталізатора

В умовах лужного каталізу (рис. 4) спочатку утворюється алкоксид-іон, що виступає у якості сильного нуклеофіла. Головною відмінністю двох різних типів каталізу є формування електрофілу в присутності кислотного каталізатору, на відміну від утворення більш сильного нуклеофілу за умов основного каталізу.

Реакцію переестерифікації за умов лужного каталізу можна розділити на чотири стадії:

1. Утворення активної форми  $\text{RO}^-$ ;
2. Нуклеофільна атака  $\text{RO}^-$  карбонільної групи триацилгліцерину, утворення тетраедричної структури;
3. Проміжний розподіл;
4. Відновлення  $\text{RO}^-$  активних частинок [32].

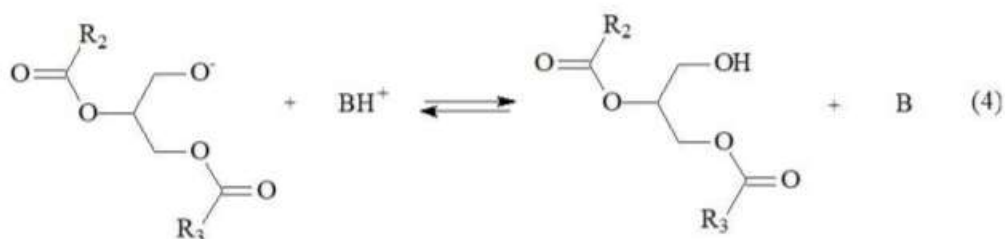
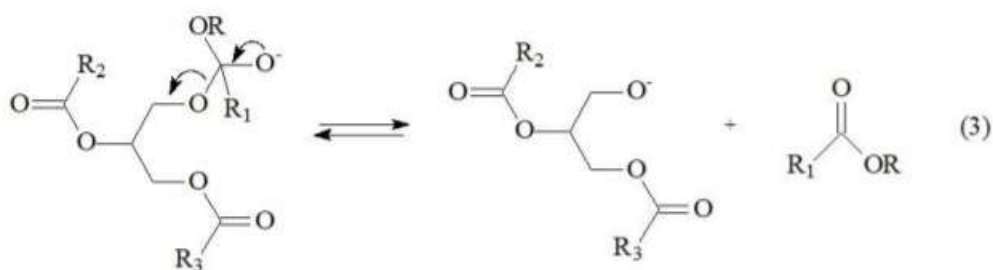
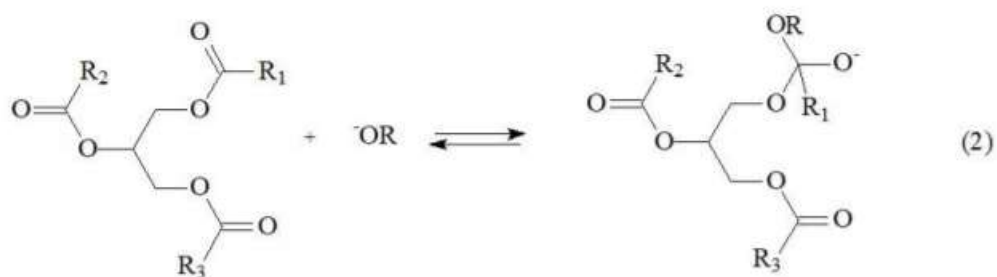


Рис.4 Механізм реакції алкоголізу тригліцеридів у присутності  
гомогенного лужного каталізатора

Естери жирних кислот (біодизельне паливо), які утворилися, можуть застосовуватися у звичайних двигунах внутрішнього згоряння без будь яких змін їх конструкції. Біодизель може існувати, як самостійний вид палива, також і у сумішах зі звичайним дизельним паливом [33].

### 1.1.3 Основні фізико-хімічні показники біодизельного палива

Швидке запровадження біодизельного палива у споживчих ринках привело до необхідності залучення нормативних документів на такий вид палива - національні стандарти до вимог за властивостями біодизеля та за вмістом його у дизельному паливі, а також відсотковим вмістом біодизелю від загального споживання дизельного палива [34].

Європейською організацією стандартів, спеціально для біодизеля був розроблений стандарт EN14214. Крім нього існують стандарти EN590 (або EN590: 2000) і DIN 51606.

У першому стандарті нормуються фізичні властивості усіх видів дизельного палива, які реалізується у Європейському союзі (ЄС), Ісландії, Норвегії та Швейцарії. За цим стандартом дозволяється вміст 5% біодизеля у нафтовому дизелі; у деяких країнах (наприклад, в Франції) усе дизельне паливо вміщує 5% біодизеля [35].

Для біодизельного палива регламентуються такі показники як кислотне число, вміст метанолу/етанолу, моно-, ди-і тригліцеридів, вільного та загального гліцерину, натрію/калію, фосфору, естерів ліноленової кислоти, поліненасичених естерів, тобто показники, що не визначаються для дизельних палив нафтового походження.

Нормування вище перерахованих показників якості не є випадковим. Високий рівень вмісту фосфору руйнує каталітичні нейтралізатори. Вільний гліцерин створює відкладення на форсунках, таким чином відбувається їх закоксовування, останній також накопичується на дні резервуару та паливних баків. Утворені гліцериди чинять негативний вплив на низькотемпературні властивості палив та збільшують відкладення на форсунках [36].

Показники якості дизельного палива нафтового походження та біодизельного палива [37] наведені в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1

Основні фізико-хімічні характеристики дизельного палива по EN 590 і біодизельного палива по ASTM 6751 EN 14214.

Показник	EN 590	ASTM 6751	EN 14214
Щільність при 15°C, кг/м <sup>3</sup> , в межах	820- 845	-	860- 900
Кінематична в'язкість при 40 ° C, мм <sup>2</sup> / с, в межах	2,0- 4,5	1,9-6,0	3,5- 5,0

Цетанове число, не менше	51	45	51
Температура спалаху, °C, не нижче	55	100	101
Вміст сірки, мг / кг, не більше	50	15	10
Зольність,% мас., Не більше	0,01	0,02	0,02
Кислотне число, мг КОН /г, не більше	-	0,8	0,5
Коксівність залишку,% мас., Не більше	0,3		0,3
Вміст води, мг / кг, не більше	200	0,005%	500
Вміст механічних домішок	Відсутнє	-	відсутнє
Йодне число, г J <sub>2</sub> / 100г, не більше	-	-	120
Корозія мідної пластинки (при 50 ° C)	Клас 1	Клас 3	Клас 1
Вміст поліненасичених жирних кислот,% мас., Не більше	-	-	12
Вміст ефірів,% мас., Не менше	-	-	96,5
Вміст метанолу,% мас., Не більше	-	-	0,2
Вміст вільного гліцерину,% мас., Не більше	-	0,2	0,2

#### 1.1.4 Переваги і недоліки біодизельного палива

На даний момент біодизельне паливо вважається найперспективнішим видом біопалива. Біодизельне паливо на відміну від викопного палива має ряд переваг:

- воно доступне та одержується з поновлювальної сировини - рослинних олій 150 видів рослин, а також із водоростей, які містять олії;
- біодизельне паливо при згорянні виділяє таку ж саму кількість CO<sub>2</sub>, що була спожита з навколишнього середовища рослиною;
- наявність біодизеля у сумішевому паливі значно зменшує викиди оксидів азоту NO<sub>x</sub> та чадного газу CO;

- біодизельне паливо має вищу на температуру займання ніж викопне паливо (понад 100 °C), яка робить його відносно безпечним;
- вміст сірки низький, на відміну від дизельного палива нафтового походження;
- при виробництві олії утворюється також макуха, яка вважається цінним білковим кормом для тваринництва;
- для вирощування рослинної біомаси, яка є сировиною для отримання біодизельного палива, застосовуються невикористовувані сільськогосподарські землі;
- біодизельне паливо на відміну від дизельного палива нафтового походження має більше цетанове число (56-58 проти 50-52), яке дозволяє його застосовувати у дизельних двигунах без добавок;
- у біодизельного палива гарні змащувальні характеристики, завдяки цьому продовжується термін служби самого двигуна та паливного насосу у середньому на 60%;
- при виробництві біодизельного палива з 1 тонни олії отримують приблизно 100 кг гліцерину;
- інвестиційні витрати та енерговитрати на виробництві невеликі;
- коли біодизельне паливо потрапляє у воду або на ґрунт воно піддається майже повному біологічному розпаду;
- застосування біодизельного палива веде до значного зниження димності відпрацьованих газів.

Разом з цим біодизельне паливо має ряд недоліків:

- короткий термін зберігання, приблизно 3 місяці;
- висока в'язкість та високий поверхневий натяг біодизельного палива, на відміну від дизельного палива нафтового походження, може привести до створення великих за розмірами крапель, які є причиною проблем, що пов'язані з системою впорскування палива;
- в холодну пору року необхідний підігрів при вмісті до 20% біодизельного палива у паливній суміші;

- нестійкість до окислення;
- більші витрати біодизеля на відміну від дизельного палива нафтового походження;

## 1.2 Хімічний склад мікроводорості *Chlorella vulgaris*

Біохімічний склад біомаси мікроводорості це співвідношення у клітинах білка, вуглеводів, жирів та мінеральних речовин, який змінюється у широких межах в залежності від умов культивування, а особливо сильно при різних стресових умовах. Це є основою для реалізації методів управління біосинтезу мікроводоростей [42].

Отже, хімічний склад мікроводорості *Chlorella vulgaris* вважається лабільним. Він залежить в першу чергу від складу живильного середовища, де вона вирощена.

В дослідях Спера і Мільнера було показано, що шляхом зміни мінерального живлення, світлових та температурних умов можна культивувати мікроводорість із різним співвідношенням поживних речовин [43], наприклад:

58% білка, 37,5% вуглеводів і 4,5% жиру;

28,3% білка, 16,2% вуглеводів і 45,5% жиру;

8,7% білка, 5,7% вуглеводів і 85,6% жиру.

В дослідях Сальниковой і Раїмова вивчений хімічний склад мікроводорості *Chlorella vulgaris*, яка вирощувалась на різних середовищах [46] (табл. 1.2).

Таблиця 1.2

Хімічний склад мікроводорості *Chlorella vulgaris*, вирощеної на різних середовищах

Середовище	Білок, %	Каротин, мг/кг	Жир, %	Зола, %	Кальцій г/кг	Фосфор, г/кг
Тамія	38	480	0,37	3,34	2,41	4,79
Тамія + 0,1% ТРФН	35	111	2,00	4,92	2,17	12,56
НС (1:20) + 0,1% ТРФН	39	262	7,49	10,10	2,30	15,30



НС (1:40) +0,1%ТРФН	43	272	4,47	10,50	1,52	14,60
------------------------	----	-----	------	-------	------	-------

Органо-мінеральні середовища вміщали в свій склад рідкий гній (1:20 і 1:40) та діамонійфосфат (2 г/л), мінеральним середовищем була середовище Тамія. У середовище вводили технічний розчин фенолята натрію у концентрації 0,1%.

Рахімов та Якубов порівнювали склад мікроводорості *Chlorella vulgaris*, яка була вирощена на середовищах 04, КП (кур'ячий послід 2,5-3,5 г л), ЕТШ (екскременти тутового шовкопряда) і ЕТШ + глауконіт. У цих дослідах на мінеральних середовищах у хлорелі утворилося більше каротину та білка, а на органічних - жиру і вуглеводів [45].

За даними Н.І Богданова мікроводорість має такий біохімічний склад (у% сухої біомаси): білок 55%, ліпіди 12%, вуглеводи 25%, зола 8% [44].

Сумарний білок водорості містить більш ніж 40 амінокислот. Також на 100 г загального азоту хлорели приходить 15,8 г аргініну; 10,2 г лізину; 7,8 г глютамінової амінокислоти; 7,7 г аланіна; 6,4 г аспарагінової амінокислоти; 6,2 г гліцину; 6,1 г лейцину; 5,8 г проліну; 5,5 г валіну; 3,5 г İzoleyцина; 3,3 г серина; 3,3 г гістидину; 2,9 г треоніну; 2,8 г тирозину; 2,8 г фенілаланіну; 2,1 г триптофану; 1,4 г метіоніну; 0,2 г цистеїну [43].

Вивчення складу білків мікроводорості *Chlorella vulgaris* проводили Хайамі і Чіно (Hayami, Shino), Фішер і Барлі (Fisher, Burlew), Фауд (Fowden), Томме і Алексєєв [45].

За даними М.Я. Сальниковой, вміст жиру у мікроводорості *Chlorella vulgaris* приблизно від 8 до 18% [46].

Ліпідний склад мікроводорості *Chlorella vulgaris* представлений такими речовинами: гліколіпіди і фосфоліпіди, моноацїлгліцероли, діацилгліцерол, фітостероли, триацилгліцеролів, вільні жирні кислоти, вуглеводи та вищі аліфатичні спирти.

Головною складовою частиною ліпідів мікроводоростів вважаються жирні кислоти. Кількісний та якісний склад жирних кислот залежить від умов культивування.

Таблиця 1.3

Вміст жирних кислот в ліпідах мікроводорості *Chlorell vulgaris* за результатами Нагорнова, Мещерякова, Дмитрієва та ін [47].

Назва кислоти	Вміст, %
Олеїнова кислота	68,3
Лінолева кислота	25,1
Стеаринова кислота	3,2
Арахідонова кислота	1,8
Ліноленова кислота	1,3
Інші кислоти	0,3

Таблиця 1.4

Кількісний склад жирних кислот ліпідів мікроводорості *Chlorella vulgaris* за результатами Клячко-Гурвич і Семененко [48].

Найменування кислоти	Формула	Вміст, %
Ліноленова	18:3	24,2
Пальмітинова	16:0	23,5
Лінолева	18:2	21,0
7,10-гексадекадієнова	16:2	12,0
7,10,13- гексадекатрієнова	16:3	11,1
Олеїнова	18:1	3,9
9-гексадеценної	16:1	2,5
Стеаринова	18:0	0,6

В сухій речовині мікроводорості *Chlorella vulgaris* міститься 8% золи [51]. Вміст макро- та мікроелементів у мікроводорості залежить від складу живильного середовища [15]. Загальний вміст вуглеводів значно коливається у залежності від умов культивування. В мікроводорості *Chlorella vulgaris*, яка вирощена у відкритих басейнах, вміст вуглеводів приблизно 8-9% сухої речовини [50]. Коли у середовищі не вистачає азоту, в клітинах мікроводорості

міститься 60% вуглеводів, у свою чергу нормальна кількість становить не більше 11%. Вуглеводи представлені моносахаридами (глюкоза, фруктоза, галактоза, ксилоза, рамноза і рибоза), дисахаридами (мальтоза, сахароза), полісахаридами (крохмаль, геміцелюлоза, рафіноза, стахіоза, декстрини, целюлоза) [49].

### **1.3 Висновок до розділу**

В розділі були розглянуті питання перспективності застосування біомаси третього покоління для одержання альтернативних моторних палив. Визначені основні переваги і недоліки біодизельного палива і розглянуті етапи його одержання переестерифікацією рослинних жирів та механізми реакції алкоголізу. З урахуванням хімічного складу мікроводорості *Chlorella vulgaris*, показана принципова можливість її використання, як сировини для виробництва біодизелю.

## **РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

### **2.1 Об'єкти дослідження**

### 2.1.1 Загальні відомості про мікроводорість *Chlorella vulgaris*

Мікроводорість *Chlorella vulgaris* являє собою мікроскопічний одноклітинний фотосинтезуючий мікроорганізм. В 1890 р вона була відкрита та класифікована датським вченим М.У. Бейжерніком [39].

Систематично мікроводорість можна віднести: до відділу – зелені водорості (Chlorophyta), класу - зелені або равножгутикові водорості (Chlorophyceae, Isocontae), порядок - хлорококкові або протококкових (Chlorococcophyceae, Protococcophyceae), сімейство - ооцістові (Oocystaceae), рід - хлорелла (*Chlorella*) [38].

Мікроводорості *Chlorella vulgaris* дуже поширена у природі. Усі її види, яких налічується приблизно 30, які можна зустріти у річках, у дрібних водоймах або у прибережній зоні великих водойм, у мінеральних джерелах різного складу, а також у ґрунті. Живучи у будь яких умовах, вони мають хорошу пристосовність до мінливих умов середовища та високу витривалість. Такі водорості переносять охолодження до декількох градусів та велике висушування. Серед них існують форми теплолюбні (термофільні), температурний оптимум життєдіяльності для них лежить у межах 35-40°C; менш теплолюбні (мезофільні), оптимальна температура для них у межах 22-27°C; низькотемпературні (кріофільні), оптимум відповідає 10-15°C.

Для нормального росту та розвитку, мікроводоростям потрібні сонячне світло, вода, вуглекислий газ та мінеральні речовини.

В умовах частих змін середовища водорості уповільнюють ріст і розвиток. В найбільш жорстких умовах, для прикладу, у зимовий час, водорості переходять у спокійний стан, виявляють сезонну періодичність активності [40].

Клітини мікроводорості *Chlorella vulgaris* поодинокі, вони містять кулясту або еліпсоїдну форму, діаметр у різних видів коливається в межах 1,5-15,0 мкм.

Клітка водорості покрита щільною гладкою целюлозною оболонкою, яка має хітин та інколи ослизнюється. В протопласті молодих клітин присутнє ядро

та чашоподібний хроматофор із великим періоїдом. Ядро водорості має гаплоїдний набір хромосом. В цитоплазмі клітини утворюється накопичення запасуючих речовин - жирів і крохмалю.

В пластидах мікроводорості присутні хлорофіли форм *a* і *b* – які у свою чергу акумулюють енергію сонячного світла для створення органічних речовин. Одна клітина здатна виконати усі життєві функції [39].

Статеве розмноження у мікроводорості досі невідомо. Розмноження проходить через автоспори, які виходять із материнської клітини через розрив оболонки. Материнська клітина у залежності від числа поділів, які відбуваються в взаємно перпендикулярних напрямках, створює у нормі кратно двом число автоспор (2,4,8,16 і т.д.).

Автоспори, які утворилися у одній материнській клітині, еквівалентні одне до одного морфологічно та фізіологічно. Число автоспор, на яке ділиться материнська клітина у деяких умовах вирощування, можна вважати постійним. Проте завжди знайдеться фракція, яка відрізняється від модального числа автоспор.

Період, коли клітина розвивається від молоді автоспори до дочірної називається життєвим циклом.

У життєвому циклі хлорели існують чотири головні фази розвитку: зростання, дозрівання, дозрівання та ділення. Процеси зростання та дозрівання клітин пов'язані із поглинанням енергії світла, дозрівання та ділення не залежать від світла. За період життєвого циклу відбувається внутрішня перебудова клітинного матеріалу, яка виражається у розподілі ядра та формуванні дочірніх клітин (автоспор).

Автоспори являють собою невеликі клітини (2,0-2,5 мкм) із витягнутою клітинною оболонкою та хлоропластом еліпсоїдної форми із точковим періоїдом. Автоспори розпочинають свій розвиток (перша фаза - зростання), хлоропласт збільшується, залишаючи довгасту форму незмінною, а також заповнює весь простір під клітинною оболонкою. Закінчення цієї фази вважається тоді, коли присутнє інтенсивне збільшення розмірів періоїда,

форма клітини змінюється на округлу. Хлоропласт із великим періоїдом в вигляді розташованого по центру сильно заломлюючого світла кулястого утворення, заповнює оболонку.

В дорослій клітині (друга фаза - дозрівання) розпочинається збільшення розмірів клітинної оболонки та хлоропласта, що періодично набуває чашеподібну форму. На кінці фази, хлоропласт, який виріс до своїх максимальних розмірів, знову заповнює приблизно весь об'єм клітини. Коли клітина досягне максимальних розмірів, її збільшення припиняється і відбуваються структурні зміни перед початком створення дочірніх клітин.

Дозрівання (третя фаза) характеризується тим, що хлоропласт, який розрісся, має неправильну творожну форму, періоїд періодично зникає та клітина переходить до поділу, формування дочірніх клітин.

Розподіл (четверта фаза) проходить покроково до утворення максимально можливого за таких умов числа автоспор. Після того як закінчилося формування дочірніх клітин відбувається розрив оболонки материнської клітини, після чого автоспори, які звільнилися, викидаються назовні.

Після того як автоспори вийдуть культура повертається назад у нульову фазу, а цикл розвитку починається спочатку. Розподіл часу за фазами можна показати таким чином: перша фаза - 3 години; друга фаза - 4 години; третя фаза - 1 година; четверта фаза - 1 година; нульова фаза - 3 години. Не дивлячись на те, що увесь процес виходу автоспор із оболонки у культурі триває приблизно 3 години, інтенсивний вихід проходить за більш короткий період (приблизно півгодини). Автоспори, які вийшли одразу починають розвиватися [40].

Ця мікроводорість відрізняється великою ефективністю фотосинтезу: більша частина вищих рослин здатна вловлювати до 3-7 % сонячного світла, а мікроводорість *Chlorella vulgaris* може засвоювати більше 25-30 %, при цьому 1 кг біомаси водорості виділяє на добу до 270 л кисню [41].

## 2.2 Методи дослідження

## 2.2.1 Методика культивування та визначення продуктивності мікроводорості

Для забезпечення відповідних умов для життєдіяльності мікроводорості *Chlorella vulgaris* у процесі культивування біомаси клітин необхідно підтримувати: оптимальну концентрацію мікро- та макроелементів, рівня освітленості та pH, температури і концентрації CO<sub>2</sub>.

Культивування клітин мікроводоростей *Chlorella vulgaris* здійснювали на середовищі Рома із додаванням 0,3 г/л глюкози.

Склад живильного середовища Рома (г/л): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,075; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O - 0,5; Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> × 4H<sub>2</sub>O - 0,0625; KNO<sub>3</sub> - 3,0.

Розчин мікроелементів містить (г/л): FeSO<sub>4</sub> × 4H<sub>2</sub>O - 10,0; EDTA - 8,0; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 2,86; MnCl<sub>2</sub> × 4H<sub>2</sub>O - 1,8; ZnSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O - 0,2; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O - 0,4; CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O - 0,08; Co (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O - 0,05. Розчин мікроелементів вноситься у кількості 1 мл на 1 л живильного середовища.

Як джерело випромінювання застосовувалася світлодіодна фітолампа Uniel E27 (9 Вт) із величиною світлового потоку 250 лм.

Суспензію перемішували повітряним потоком за допомогою 4-х каналного компресора Sobo SB-948.

Щоб підтримувати постійну температуру застосовували акваріумний нагрівач Aquael EASYHEATER (25 W). Оптимальна температура для культивування - 28-29 ° C.

Оцінку продуктивності мікроводоростей визначили методом підрахунку клітин культури за стандартним для мікроскопії методикою [52], за допомогою камери Горяєва на мікроскопі ZEISS Axio Imager Z1. Для запобігання похибок, підрахунок клітин проводили три рази

Число клітин мікроводоростей у 1 мл досліджуваної суспензії

визначали за формулою:  $n = N_{\text{б.кв.}} \cdot 2,5 \cdot 10^5$

де n - кількість клітин на мл;

N<sub>б.кв.</sub> - кількість клітин над квадратом великим.

### **2.2.2 Методика концентрування, сушіння і дезінтеграції біомаси мікроводорості**

Концентрування біомаси мікроводоростей *Chlorella vulgaris* проводили центрифугуванням, при обертанні центрифуги 4000 хв-1 протягом 5 хвилин.

Біомасу сушили у сушильній шафі при температурі 55-60 ° С.

Після досягнення вологості біомаси 10% та менше, проводили дезінтеграцію клітин впливом СВЧ випромінюванням при потужності 280 Вт та частотою 2450 МГц протягом 30 секунд.

### **2.2.3 Методика екстракції біомаси мікроводорості**

Із біомаси мікроводоростей *Chlorella vulgaris* вилучення ліпідів здійснюється методом Блай-Дайера та в екстракторі Сокслета.

Екстракцію ліпідів за методом Блай-Дайера, проводять в апараті із механічною мішалкою сумішшю гексан-ізопропанол (об'ємному співвідношенні 1:1) із розрахунку дві частини суміші розчинників на одну частину сировини.

Суху масу мікроводоростей поміщали у колбу, заливали сумішшю розчинників, перемішували при температурі не більше 47° С у протягом 140 хв. Щоб утворити двухфазну систему додавали 0,9% розчин KCl у кількості 0,25 частин від об'єму екстракту. У результаті утворюється двухфазная система, де нижній шар складеться із гексану і жиру, а верхній шар - із суміші води та ізопропанолу. Відбирали нижній шар, потім відганяли розчинник на ротаційному випарнику. Отриманий ліпідний залишок висувували до постійної маси.

У разі екстракції в апараті Сокслета. суху біомасу мікроводоростей поміщали у патрон із фільтрувального паперу, попередньо знежирений. Колбу наповнювали розчинником приблизно на 2/3 об'єму, у екстрактор апарату Сокслета поміщали патрон так, щоб він не був вище верхнього вигину сифонної трубки. Температуру екстракції встановлювали так, щоб протягом 1 години відбувалось 6-7 зливів розчинника. Екстракцію проводили протягом 7



годин. Після закінчення екстракції розчинник із колби відганяли із використанням ротаційного випарника.

Після випаровування розчинника колбу поміщали у сушильну шафу та висушували при температурі 105°C протягом 1 год, охолоджували в ексикаторі та зважували. Інші зважування проводили після повторного сушіння протягом 30 хв. Висушування та зважування повторювали, поки різниця двох послідовних зважувань буде не більше 0,001 г.

Вихід ліпідів (%мас.) Обчислювали як відношення маси екстракту після видалення екстрагента до біомаси, взятої для аналізу.

Для синтезу етилових естерів жирних кислот (біодизельного палива) використовували виділені ліпіди.

#### **2.2.4 Визначення ліпідного складу методом тонкошарової хроматографії**

Для того щоб поділити суміші ліпідів на окремі компоненти використовували пластинки із тонким шаром силікагелю ПТСХ-В фірми "Sorbfil". Пластинки активуються 30 хв при температурі 100-110°C для видалення води та збільшення адсорбційної здатності силікагелю [59].

Досліджувані суміші ліпідів (0,1 мл) наносили смугами довжиною 1 см на відстані 1,5 см від нижнього краю пластинки та 1,0-1,5 см - від бокового. Відстань між смугами 1,0 см. При нанесенні потрібно отримати як можна менший розмір ширини смуги та не порушити шар сорбенту. На пластинці разом із аналізованими зразками наносимо також по 0,1 мл розчинів ліпідів (0,1% розчини у хлороформі) [60].

Пластинки із нанесеними пробами ставили у хроматографічну камеру, у яку попередньо наливали розчинник шаром від 0,7-1,0 см. Камера повинна бути вирівненою, мати щільно закриту кришку та бути насичена парами розчинника, це досягається вистиланням внутрішніх стінок камери фільтрувальним папером. Для того щоб поділити ліпіди використовували суміш гексану: діетиловий ефір: оцтова кислота у співвідношенні 73:25:2. Розділення ліпідів

триває доти, поки фронт розчинника не дійде до рівня, віддаленого від верхнього краю на 0,5-1,0 см.

Для того щоб виявити ліпіди використовували пари йоду (Недеструктивний реагент). Пластинку із камери після висушування у витяжній шафі поміщали в ексикатор із кристалічним йодом на 5-10 хв. Ліпіди проявляються у вигляді жовто-коричневих плям. Проявлені платівки у парах йоду, довго не зберігаються, бо йод поступово випаровується. Для того щоб фіксація результатів була успішна роблять фотокопії пластин [61]. Значення  $R_f$ , які отримали, порівнюються з значеннями  $R_f$  контрольних речовин та ідентифікуються сполуки, присутні у зразку [62].

### **2.2.5 Визначення жирнокислотного складу хроматографічним методом**

Пробу із досліджуваною олією добре перемішують.

У центрифужну пробірку беруть піпеткою 2-3 краплі олії, розчиняють їх у 1,9 см<sup>3</sup> гексану. У розчин вводять 0,1 см<sup>3</sup> розчину етілату натрію в етанолі із концентрацією 2 моль/дм<sup>3</sup>.

Після інтенсивного перемішували протягом 2 хв реакційну суміш відстоюють 5 хв та фільтрують через паперовий фільтр. На хроматографі встановлюють умови аналізу олій, що не містять низькомолекулярні кислоти.

Методом внутрішньої нормалізації проводять розрахунок складу етилових ефірів, жирних кислот масла

Площа піку компонента  $S_i$ , мм<sup>2</sup>, обчислюють за формулою (2.1):

$$S_i = h_i * a_i \quad (2.1)$$

де  $h_i$  - висота піку, мм;  $a_i$  - ширина, виміряна на половині висоти, мм

Суму площ усіх піків на хроматограмі  $\sum_i S_i$  приймають за 100%.

Масову частку кожної кислоти масла  $X_i$  обчислюють за формулою (2.2):

$$X_i = \frac{S_i * 100}{\sum_i S_i} \quad (2.2)$$

де  $S_i$  - площа піку етилового ефіру, мм<sup>2</sup>;

$\sum_i S_i$ - сума площ усіх піків на хроматограмі,  $\text{мм}^2$  [63].

### **2.2.6 Синтез етилових естерів жирних кислот (біодизельного палива)**

У круглій колбі ємністю 100 мл, з механічною мішалкою та зворотнім холодильником, поміщали у термостат. Вводили 5 г олії та каталізатор у кількості 0,1 г в 8,6 мл (мольне співвідношення 1:20) або у 3,9 мл (мольне співвідношення 1: 9) абсолютизованого етилового спирту. Суміш перемішували при кипінні протягом 600 та 120 хвилин. Після того як реакційна суміш охолодилась розділяли її на дві фази. Де верхня фаза складається із етилових естерів, жирних кислот, а нижня містить гліцерин, залишковий етиловий спирт, сірчану кислоту, не велику кількість дии-моногліцеридів. Етилові ефіри жирних кислот відокремлюємо на ділительній воронці, промиваємо водою до утворення нейтральної реакції та сушимо  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  [65,66].

## **2.3 Висновок до розділу**

В розділі розглянуті методи культивування і дослідження клітинного складу мікроводорость *Chlorella vulgaris*. Методи дослідження були спрямовані на культивування та визначення ліпідів і жирних кислот хроматографічним методом, також Синтез етилових естерів жирних кислот для отримання біодизельного палива.

### **РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЦЕСУ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРОВОДОРОСТІ CHLORELLA VULGARIS І ВИЗНАЧЕННЯ СКЛАДУ ЇЇ ЛІПІДНОЇ ФРАКЦІЇ**

#### **3.1. Культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* з використанням комунально-побутових стічних вод як поживного середовища**

В роботі було проаналізовано культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* відбувалось з використанням комунально-побутових стічних вод як поживного середовища, посилаючись на експеримент який був виконаний “Казахським національним університетом імені аль-Фарабі”.

У роботі використовували штами мікро-водоростей *Chlorella vulgaris* вилучені з стічних вод очисних споруджень м.Алмати та колекції лабораторії біотехнології КазНУ ім. аль-Фарабі.

Мікроводорості вирощували на живильному середовищі при освітленні ламп денного світла (4000 люкс) і температурі 25-28 С. В експерименті використовували лабораторний мікробіореактор об'ємом 40 л. Стічна вода відбиралася у двох різних місцях: [70]

- проба 1 вторинний відстійник після аеротенка,
- проба 2 та 3 - водоканал.

Аналіз якості стічних вод у відстійнику після біологічної очистки очисної споруди показав, що вміст забруднюючих речовин у них перевищує норму гранично допустимих концентрацій.[70]

Для того щоб визначити оптимальну концентрацію стічних вод, для культивування виділених водоростей *Chlorella vulgaris* і колекційних штамів *Parachlorella kessleri* DZP-5, *Parachlorella kessleri* Uz-1 мікроводорості культивують на трьох різних середовищах:

- варіант 1 (стічна вода),

- варіант 2 (стічна вода + чиста вода в співвідношенні 50%: 50%)
- варіант 3 (стічна вода + живильне середовище Тамія, в співвідношенні 50%: 50%).

Стічна вода була відібрана з водоканалу після біологічної очистки. Термін інкубації проводився протягом 14 днів, з початковим числом клітин -  $1 \times 10^6$  кл/мл у суспензії (рисунок 3.1). [70]

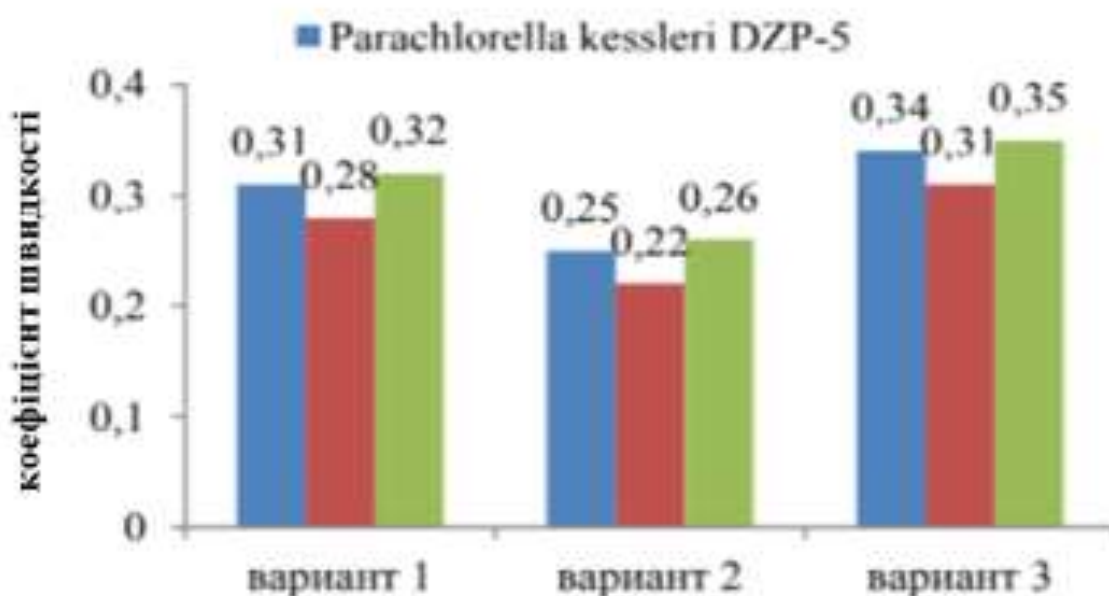


Рис 3.1 Коефіцієнти швидкості росту виділених штамів, культивованих у різних середовищах

З діаграми ми бачимо, що усі досліджувані культури мають інтенсивний ріст у третьому варіанті, у зв'язку із багатим мінеральним складом середовища.

Безперечно можна заявляти, що додаткове додавання мікро-і макроелементів в стічну воду підвищує прискоренню процесу біоремедіації.

Був проаналізований фізико-хімічний склад стічних вод після альголізації (таблиця 3.1)[70].

Аналіз наведених у таблиці даних показав, що у результаті досліду відбулося зменшення концентрації органічних забруднень ( $БСК_5$ ) в середньому 75%. (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1

Фізико-хімічний склад стічних вод до і після культивування в ньому штаму мікроводорості *Chlorella vulgaris*

№п.п.	Характеристика	Результати		Одиниця вимірювання	% очищення
		Контроль	Дослід		
1	рН	7,0	7,3		-
2	Зважені речовини	58	4,06	Мг/л	93%
3	запах	5	0	бали	100%
4	БСК <sub>5</sub>	57	8,71	мгО <sub>2</sub> /л	97%
5	Окислюваність	38	1,9	мгО <sub>2</sub> /л	95%
6	Аміак	9	-	Мг/л	100%
7	Нітрити	0,2	-	Мг/л	100%
8	Нітрати	0,8	-	Мг/л	100%
9	Фосфати	3,9	-	Мг/л	100%

Тому ефективним способом очищення забруднених вод, може бути їх альголізація, крім того мікроводорості є природнім джерелом таких компонентів як (білки, вуглеводи, жири і т.д.). Це означає, що необхідність у отриманні великої кількості маси водоростей є також шляхом для вирішення екологічної, кормової проблеми.

На прикладі вирощування культури мікроводоростей *Chlorella vulgaris* в лабораторному фотобіореакторі з стічними водами і живильним середовищем Тамія, із співвідношенні 50%:50%, що протягом 18 діб, при температурі 27-28°C із безперервним освітленням в 4000 люкс була досліджена динаміка росту клітин активного штаму (рис 3.2). Первине число клітин активного штаму водоростей становило  $0,3 \times 10^6$  кл/мл [70]. Під час експерименту число клітин мікроводоростей збільшувалася і досягла максимуму на 16 добу культивування, що становило -  $50 \times 10^6$  кл/мл. [70]

Із 17 дня експерименту культивування клітин мікроводоростей характеризувалося невеликим зниженням числа клітин. По закінченню 18 доби культивування, кількість сухої маси становила - 8,5 г/л.

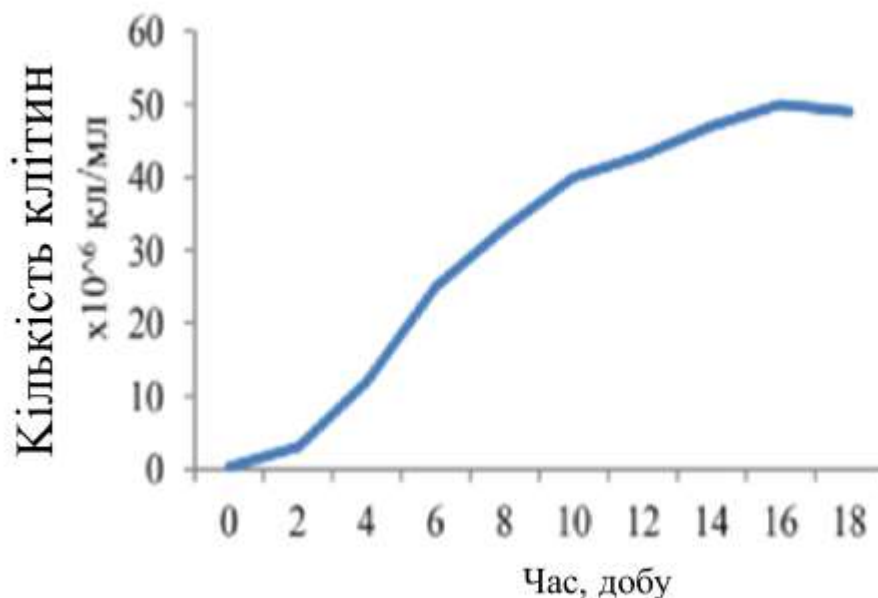


Рис 3.2 Динаміка росту клітин активного штаму мікроводорості *Chlorella vulgaris*

### 3.2. Визначення складу ліпідної фракції мікроводорості *Chlorella vulgaris*

Було проаналізовано основні компоненти клітин виділеного штаму мікроводоростей, вирощених на комунально-побутових стічних водах [70].

У результаті хімічного аналізу клітини *Chlorella vulgaris*, вміст білків становив 35%, вуглеводів - 29%, ліпідів - 30%, зола - 6% від сухої ваги (рис 3.3)[70 ].

Основна кількість компонентів у клітинах штаму досягала високого показника ліпідів та білків, що свідчить про можливість використання штаму *Chlorella vulgaris* із подвійною користю як в екологічній, так і в біоенергетичній сфері.

Для визначення складу ліпідної фракції проведено її спектроскопічний аналіз методом коливальної спектроскопії. Для порівняння використаний ІК-спектр рафінованої ріпакової олії (рис. 3.4).

Спектральні характеристики триацилглицеридів різних рослинних олій практично ідентичні. Порівняння основних смуг коливання в діапазоні дозволяє зробити висновок про те, що і в складі ліпідної фракції, отриманої в результаті екстракції біомаси мікробіодорості *Chlorella vulgaris*, містяться естери, аналогічні триацілглицеридам рослинних олій. Найбільш характерними для естерів можна вважати валентні коливання карбонільної групи (зв'язку C = O). В спектрах добре видна відповідна сильна смуга при  $1744\text{ см}^{-1}$  (рапсове масло) і  $1734\text{ та }1737\text{ см}^{-1}$  (ліпідна фракція екстракту).

З метою використання штаму *Chlorella vulgaris* в біоенергетиці, був проведений хроматографічний аналіз на жирнокислотність клітин досліджуваного штаму. У результаті експерименту у клітинах досліджуваного штаму водоростей були визначені жирні кислоти, із них такі важливі, як лауринова, пальмітинова, миристинова, стеаринова та лінолева кислота. У співвідношенні: лінолева ( $4,7962 \times 10^{-3}$  мг) > пальмітинова ( $2,5139 \times 10^{-3}$  мг) > стеаринова ( $0,4355 \times 10^{-3}$  мг) > миристинова ( $0,12085 \times 10^{-3}$  мг) > лауринова ( $0,0525 \times 10^{-3}$  мг). [70]



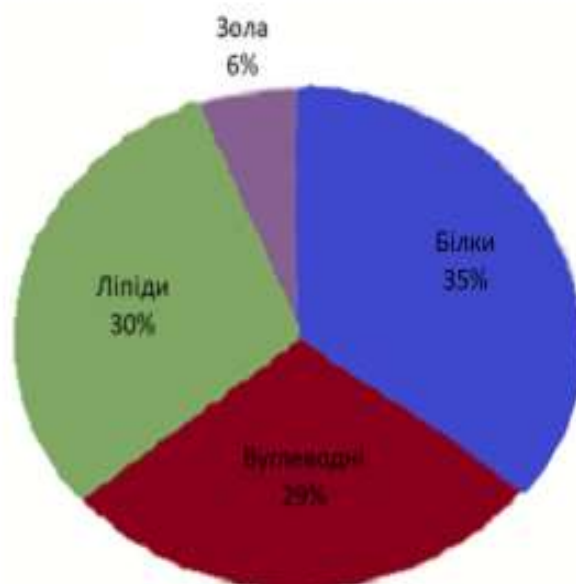


Рис 3.3 Співвідношення основних клітинних компонентів штаму *Chlorella vulgaris*

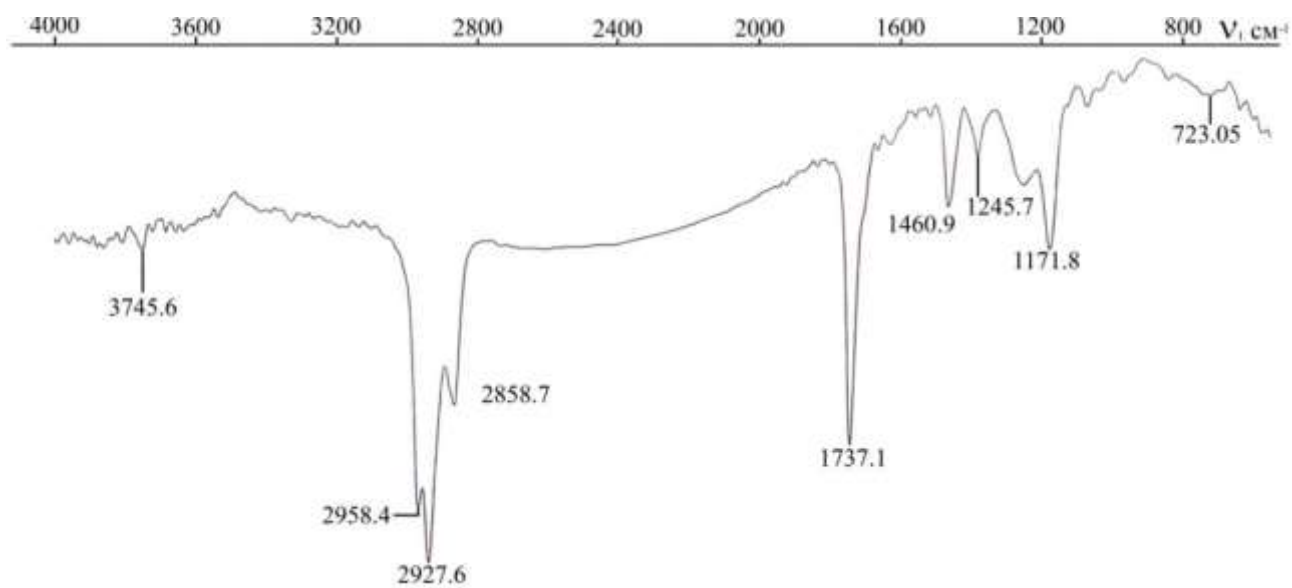


Рисунок 3.4. – ІК-спектр ліпідної фракції мікробіодорості *Chlorella vulgaris*

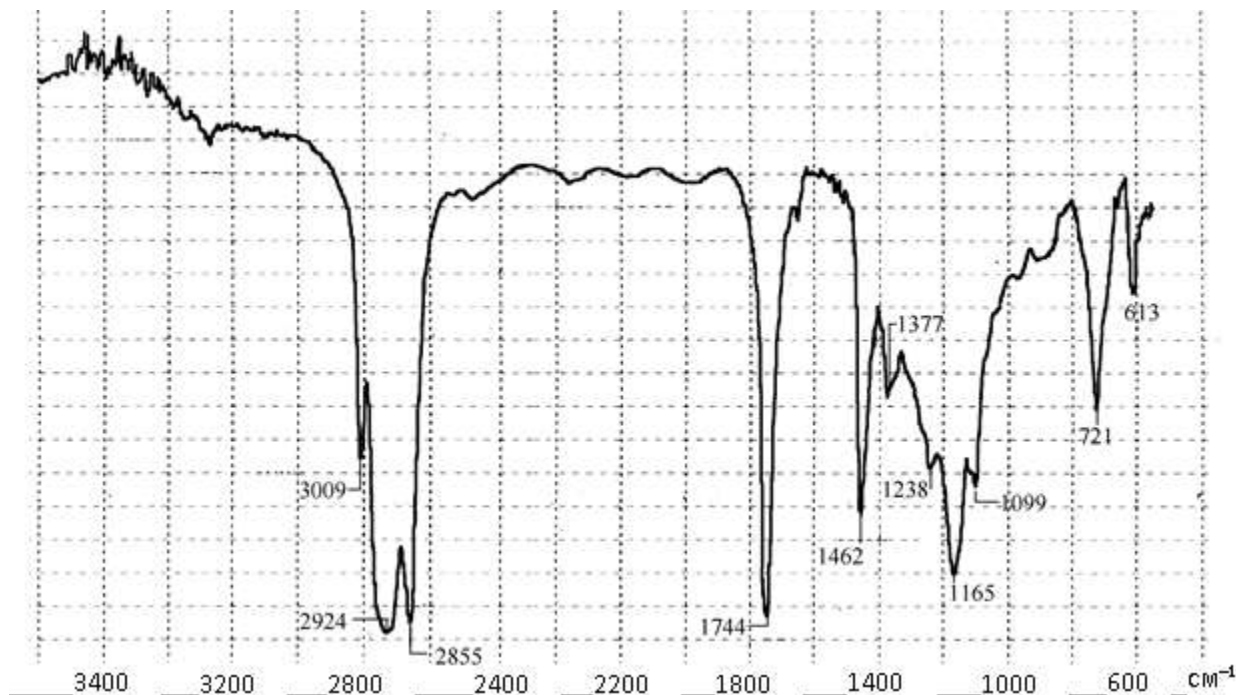


Рисунок 3.5. – ІК-спектр рафінованої ріпакової олії

### 3.2 Висновок до розділу

У результаті масштабного культивування штаму мікроводоростей *Chlorella vulgaris* на стічних водах із співвідношенні 1:1 у живильному середовищі, максимальне зростання припадає на 16 добу культивування, кількість клітин при цьому становить -  $50 \times 10^6$  кл/мл.

Спектральні характеристики триацилглицеридів рослинних олій практично нічим не відрізняються від ліпідної фракції мікроводорості *Chlorella vulgaris*.

Біохімічний аналіз клітин штаму мікроводоростей *Chlorella vulgaris* показав вміст білків, що становить 35%, вуглеводів - 29%, ліпідів - 30%, золи - 6% від сухої маси, це у свою чергу показує про можливість використання штаму *Chlorella vulgaris* з подвійною користю у екологічній, біотехнології і біоенергетиці сфері.

## ВИСНОВКИ

Результати які були становлені теоретично стали підґрунтям для вирішення актуальних науково-технологічних проблем, які стосуються підвищенням вмісту ліпідної фракції у клітинах мікроводорості *Chlorella vulgaris*, що дозволяє створити ефективну біотехнологію культивування мікроводоростей з високим вмістом ліпідів, як вихідної сировини для отримання біодизельного палива.

Із результатів ми можемо побачити, що мікроводорості які були культивовані на стічних водах із співвідношенні 1:1 у живильному середовищі, із спектральних характеристик тригліцеридів вони є ідентичні з рослинами у яких великий вміст олій. Із проаналізованого аналізу видно, що штам мікроводорості *Chlorella vulgaris* містить більше 30% ПНЖК у клітині. Роблячи

підсумок отриманих даних можна зробити висновок, що вирощування штаму мікроводоростей *Chlorella vulgaris* у оптимальних умовах дає змогу використовувати його для великомасштабного культивування із метою виробництва біодизеля

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ**

1. Klass L. Organic Commodity Chemicals from Biomass. Biomass for Renewable Energy // Fuels and Chemicals. 1998. P. 495-546.
2. Рустамов Н. А., Зайцев С.И., Чернова Н.И. Биомасса - источник энергии // Энергия. 2005. № 6. С. 20-28.
3. Технология получения липидов из микроводорослей [Электронный ресурс]: монография / Д. С. Дворецкий, С. И. Дворецкий, М. С. Темнов [и др.]. - Тамбов: Изд-во ФГБОУ ВПО «ТГТУ», 2015.
4. Chisti Y. Biodiesel from microalgae // Biotechnology Advances. 2007. Vol. 25. P. 294-306.

5. Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol // Trends Biotechnol. 2008. Vol. 3. P. 126-131.
6. Renewables 2013 Global Status Report (Paris: REN21 Secretariat) [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.ren21.net/REN21Activities/GlobalStatusReport.aspx> (дата обращения: 16.02.2018).
7. Campbell, C. J. The coming oil crisis / C. J. Campbell // Multi-science Publishing Company and Petroconsultants. - S. A Essex, 1997. - 456 с.
8. Сорокина К.Н., Яковлев В.А., Пилигаев А.В. и др. Потенциал применения микроводорослей в качестве сырья для биоэнергетики / К.Н. Сорокина, В.А. Яковлев, А.В. Пилигаев, Р.Г. Кукушкин, С.Е. Пельтек, Н.А. Колчанов, В.Н. Пармон // Катализ в промышленности. - 2012. - №2. - С. 63-72.
9. Муртазина Э.И. Получение биотоплива из водорослей с использованием нанотехнологий в университете штата Аризона (США) / Э.И. Муртазина // Вестник Казанского технологического университета. - Казань, 2012. - Т.15. №18. - С.212-216.
10. Технология получения липидов из микроводорослей [Электронный ресурс] : монография / Д. С. Дворецкий, С. И. Дворецкий, М. С. Темнов [и др.]. - Тамбов : Изд-во ФГБОУ ВПО «ТГТУ», 2015. 90
11. Рустамов Н. А., Зайцев С.И., Чернова Н.И. Биомасса - источник энергии // Энергия. 2005. № 6. С. 20-28.
12. Гафуров Н.М., Хисматуллин Р.Ф. Особенности производства биодизельного топлива из биомассы / Н.М. Гафуров, Р.Ф. Хисматуллин // Международный научный журнал “Инновационная наука”. 2016. №5. С 68-69.
13. Горохов Д.Г., Бабурина М.И., Иванкин А.Н. и др. Жидкое биотопливо из растительного и животного сырья. Технические и экономические аспекты / Д.Г. Горохов, М.И. Бабурина, А.Н. Иванкин, О.П. Прошина // Лесной вестник. 2010. №4. С 74-78.
14. Феофилова Е.П., Сергеева Я.Э., Ивашечкин А.А. Биодизельное топливо: состав, получение, продуценты, современная биотехнология (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология, 2010, том 46, № 4, с. 405-415.

15. Huntley, M. E. CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal / M. E. Huntley, D. G. Redalje // *Mitig Adapt Strat Glob Change*. - 2007. - N 12. - P. 573. - 608.

16. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production / P. M. Schenk, R. Skye, Thomas-Hall [et al.] // *Bioenergy Res* 1. - 2008. - P. 20-43.

17. Prospects of biodiesel production from microalgae in India / S. A. Khan, M. Z. Rashmi Hussain, S. Prasad, UC. Banerjee // *Renew Sust Energ Rev* 13. - 2009. - P. 2361 - 2372.

18. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor / L. Rodolfi, GC. Zitelli, N. Bassi [et al.] // *Biotech Bioeng* 102. - 2009. - P. 100-112.

19. Мещерякова Ю.В. Технология получения биодизельного топлива из биомассы микроводоросли // *Наука в центральной России*. - 2013. - № 3. - С. 76-79. 91

20. Способ культивирования биомассы с повышенным содержанием липидов // Патент России № 2569149 / Темнов М.С., Дворецкий С.И., Пешкова Е.В., Дворецкий Д.С и др.

21. Zijffers J.-W. F., Salim S., Janssen M., Tramper J., Wijffels R.H. . Capturing sunlight into a photobioreactor: Ray tracing simulations of the propagation of light from capture to distribution into the reactor // *Chemical Engineering Journal*. 2008. Vol. 145. P. 316-327.

22. Becker, E.W. *Microalgae: Biotechnology and microbiology*. - USA: Cambridge University Press, 1994.

23. Flocculation of microalgae using cationic starch / D. Vandamme, I. Foubet, B. Meesschaert, K. Muylaert // *J Appl Phycol*. - 2010. - N 22. - P. 525-530.

24. Poelman, E. Potential of electrolytic flocculation for recovery of microalgae / E. Poelman, N. De Pauw, B. Jeurissen // *Resources, Conservation and Recycling*. - 1997 - N 19. - P. 1-10.

25. Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement / N. Uduman, Y. Qi, M. K. Danquah, A. F. A. Hoadley // Chemical Engineering Journal. - 2010. - N 162. - P. 935-940.

26. Lee, A. K. Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel / A. K. Lee, D. M. Lewis, P. J. Ashman // J Appl Phycol. - 2009. - N 21. - P. 559-567. 27. Митишев, А.В. Микроводоросль хлорелла - источник резиноида /А.В. Митишев // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии: мат. международной научной интернет-конференции. - Казань: ИП Синяев Д.Н. - 2013. - Т 2. - с. 24-27.

28. Мещерякова Ю.В., Нагорнов С.А. Получение сырья для биодизельного топлива на основе масла микроводоросли хлорелла // Инновации в сельском хозяйстве. - 2013. - №3 (5). - С. 39-41.

29. Биоэнергетика: мировой опыт и прогноз развития: Науч. аналит. обзор [Текст] / под ред. д.э.н. С.Г. Митина - М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2007. - 204 с. 92

30. Федоренко, В.Ф. Состояние и развитие производства биотоплива: науч. аналит. обзор [Текст] / В.Ф. Федоренко, Ю.Л. Колчинский, Е.П. Шилова. - М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2007. - 131 с.

31. Нагорнов, С.А. Технологический процесс получения биодизельного топлива из растительных масел [Текст] /С.А. Нагорнов, О.В. Матвеев, А.П. Ликсутина // Сб. научн. тр. ГНУ ВИИТиН. Вып. № 12. - Тамбов: ГНУ ВИИТиН. - 2006. - С. 91-98

32. Ликсутина, А.П. Улучшение качества и экологических свойств дизельного топлива за счет использования биологического компонента [Текст]: автореф. дисс. канд. ... техн. наук: 05.20.01 и 05.20.03 / Ликсутина Анна Павловна. - Мичуринск, 2006. - 23 с.

33. Фокин, Р.В. Разработка интегрированной технологии получения смесового топлива, улучшающего эксплуатационные показатели

автотракторных дизелей [Текст]: автореф. дисс. канд.... техн. наук: 05.20.03 / Фокин Роман Владимирович - Мичуринск, 2008. - 23 с.

34. Павлов, С.С. Улучшение качества нефтяного дизельного топлива за счет применения биодобавок [Текст]: - дис. ...канд. техн. наук: 05.20.03 / Павлов Сергей Сергеевич. - Мичуринск, 2013. - 171 с.

35. Мещерякова, Ю.В. Синтез бифункциональных кислородсодержащих соединений [Текст] / Ю.В. Мещерякова, С.А. Нагорнов // Наука в центральной России. - 2014. - №1 - С.69-78.

36. Мифтахова Л.Х. Промышленные методы производства биодизельного топлива

37. ГОСТ 32511-2013 (EN 590:2009) Топливо дизельное ЕВРО. Технические условия. Введ. 2015-01-01 - М.: Стандартиформ, 2014. - 19 с.

38. Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли - СПб.: Наука, 1998. - 351 с.

39. Лисовский Г.М. Управляемое культивирование микроводорослей - М.: Наука, 1964. - 153 с. 93

40. Аманов Ч. А., Пискунова А. В. Рост хлореллы в разноориентированных слоях при естественном облучении // Культивирование и применение микроводорослей в народном хозяйстве. - Ташкент: Фан, 1964. - С. 23- 24.

41. Богданова, А.А. Влияние различных концентраций питательной среды на увеличение биомассы микроводоросли штамма ИФР № С-111 / А.А. Богданова, Е.А. Флерова // Сборник научных трудов по материалам XVI Международной научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых ФГБОУ ВПО «Ярославская ГСХА», Ярославль: Ярославская ГСХА. - 2013. - С. 18-22.

42. Богданов Н.И. Хлорелла: зеленый корм круглый год / Н.И. Богданов // Комбикорма. - 2004. - № 3. - С. 66.



43.Мельников С.С. Хлорелла: физиологически активные вещества и их использование / С.С. Мельников, Е.Е. Мананкина. - Минск: Наука і тэхніка, 1991. - 79 с.

44.Богданов Н.И. Использование хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных / Н.И. Богданов // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2004. - № 1. - С. 34- 36.

45. Полубояринов П.А., Андреев С.Ю., Гарькина И.А., Давыдов И.П. Оценка химического состава биомассы хлореллы, используемой в процессах естественной биологической очистки сточных вод // Regional architecture and engineering, 2014 №3 с. 75-81.

46.Сальникова М.Я. Хлорелла - новый вид корма - М.: Колос, 1977. - 96 с.

47. Нагорнов С.А., Мещерякова Ю.В., Дмитриев В.М., Ликсутина А.П., Ерохин И.В. Извлечение и анализ липидов из биомассы микроводорослей хлорелла // Наука в центральной России. - 2015. - № 3. - С. 11-17.

48.Цоглин Л.Н. и Пронина Н.А. Биотехнология микроводорослей - М., Научный мир, 2012. - 184 с. 94

49.BERTOLDI FC, SANT'ANNA E AND OLIVEIRA JLB. 2008. Chlorophyll content and mineral profile in the microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. Cienc Rural 38: 54-58

50.Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. и др. Методы физиологобиохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наук. думка, 1975. 248 с.

51. Хлорелла для человека [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.xn--80ajrbapo1b.xn--p1ai/chlorella-dlya-cheloveka-menu.html>. Дата обращения: 6.01.2017.

52. Прунтова О.В. Лабораторный практикум по общей микробиологии / О.В. Прунтова, О.Н. Сахно; Владим. гос. ун-т. - Владимир: Изд-во ВлГУ, 2005. - 76 с.

53. ГОСТ 13496.4-93 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания азота и сырого протеина. Введ. 01.01.1995. - М.: Изд-во стандартов, 2011.

54. М-02-902-142-07 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методика выполнения измерений массовой доли аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Санкт-Петербург, 2007. - 15 с.

55. Базарнова Н.Г. Химия древесины и ее основных компонентов. Барнаул, 2002.

56. ГОСТ 31671-2012 (EN 13805:2002) Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Подготовка проб методом минерализации при повышенном давлении. Введ. 01.07.2013. - М.: Изд-во стандартов, 2013. - 7 с.

57. ГОСТ 13496.15-97. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания сырого жира. - Введ. 1999-01-01. - М.: Изд-во стандартов, 2011. - 11 с. 95

58. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография / Пер. с англ. Д. Н. Соколова и М. И. Яновского, под ред. В. Г. Берёзкина. - М.: Мир, 1981. - Т. 1. - 616 с.

59. Тонкослойная хроматография липидов. Учебно-методическое пособие/ Составители: Т.А. Веселова, А.П. Веселов, А.В. Дерюгина. - Н. Новгород: ННГУ, 2015.

60. Технология получения липидов из микроводорослей [Электронный ресурс] : монография / Д. С. Дворецкий, С. И. Дворецкий, М. С. Темнов [и др.]. - Тамбов : Изд-во ФГБОУ ВПО «ТГТУ», 2015.

61. Сравнительный анализ каротиноидов облепихового масла методом тонкослойной хроматографии. Курегян А.Г., Печинский С.В., Карандеева Е.А. - Пятигорский медико-фармацевтический институт.

62. Биохимия липидов : практикум для студентов биол. фак. спец. 1-31 01 01 “Биология”, специализации 1-31 01 01 - 05 “Биохимия” / сост. Н.М. Орел. - Минск: БГУ, 2007. 35 с.

63. ГОСТ 32915-2014. Молоко и молочная продукция. Определение жирнокислотного состава жировой фазы методом газовой хроматографии. - Введ. 2016-01-01. - М.: Изд-во стандартов, 2015. - 10 с

64. Пат. 2480746 Российская Федерация, G01N33/15. Способ количественного определения полисахаридов в траве видов рода фиалка / А.М. Мартынов, Т.Д. Даргаева (РФ).

65. Миндиярова Э.Р., Вершинин С.С., Зорина Л.Н. Алкоголиз соевого масла этанолом в условиях конвекционного и микроволнового нагрева / Э.Р. Миндиярова, С.С. Вершинин, Л.Н. Зорина, Р.Н. Шахмаев, В.В. Зорин // Башкирский химический журнал. - 2013. - Т.20. - №3. - С. 139- 141.

66. Антонова З.А., Крук В.С., Курсевич В.Н. Получение и свойства этиловых эфиров рапсового масла / З.А. Антонова, В.С. Крук, В.Н. Курсевич, Ю.В. Максимук, М.Г. Кривова // Вестник БГУ. - Сер.2. - 2015. - №1. - С. 7-12.  
96

67. Huntley M., Redalje D. CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal // Mitigation and adaptation strategies for global change. – 2007. – V.12. – P. 573–608.

68. Лурье Ю. Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. – 284 с.

69. Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф., Лукина Л.Ф. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев: Наукова думка, 1975. – С. 247.

70. Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан